

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09065885 A**

(43) Date of publication of application: **11.03.97**

(51) Int. Cl

**C12N 15/09**  
**C07H 21/04**  
**C07K 7/06**  
**C07K 7/08**  
**C07K 14/485**  
**C12P 21/02**  
**// A61K 38/00**  
**(C12P 21/02 , C12R 1:19 )**

(21) Application number: **08099684**

(22) Date of filing: **29.03.96**

(30) Priority: **31.03.95 JP 07 99980**  
**19.06.95 JP 07175540**

(71) Applicant: **SUMITOMO ELECTRIC IND LTD**

(72) Inventor: **KOSHIDA SHOGO**  
**OKA YUMIKO**  
**HIRAI YOHEI**

**(54) TAILORED DERIVATIVE OF EPIMORPHIN**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new tailored derivative of epimorphin useful for developing wound healing medicines by eliminating a hydrophobic region in the C terminal and a part of amino acids at least in one region of coiled coil regions in both terminals from the total length of epimorphin.

**SOLUTION:** This new tailored derivative of epimorphin comprises a polypeptide having a structure in which the hydrophobic region of C terminal is removed and, at the same time, at least a part of amino acids is removed from at least one terminal in coiled coil regions from the total length of epimorphin having the coiled coil region in the N terminal side, a functional domain in the central part, the coiled coil region in the C terminal side and the hydrophobic region in the C terminal. It is useful for developing a diagnosis and a therapy of diseases caused by morphogenetic disorders of epithelial tissues, a

vulnerary therapy, etc. The tailored derivative of epimorphin can be obtained by separating DNA from mesenchymal cells manifesting epimorphin, preparing epimorphin cDNA using the same, and varying cDNA into a gene of the tailored derivative and manifesting the gene in host cells.

**COPYRIGHT: (C)1997,JPO**

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-65885

(43) 公開日 平成9年(1997)3月11日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 7/06			C 0 7 K 7/06	
7/08			7/08	
14/485			14/485	

審査請求 未請求 請求項の数13 F D (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-99684	(71) 出願人	000002130
(22) 出願日	平成8年(1996)3月29日		住友電気工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願平7-99980		大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号
(32) 優先日	平7(1995)3月31日	(72) 発明者	越田 将悟
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電
(31) 優先権主張番号	特願平7-175540		気工業株式会社横浜製作所内
(32) 優先日	平7(1995)6月19日	(72) 発明者	岡 由美子
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電
			気工業株式会社横浜製作所内
		(72) 発明者	平井 洋平
			神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電
			気工業株式会社横浜製作所内
		(74) 代理人	弁理士 西川 繁明

## (54) 【発明の名称】 エピモルフィン改変体

## (57) 【要約】

【課題】 エピモルフィンの生理活性を高度に保持し、しかも調製及び精製が容易なエピモルフィン改変体及びその変異体を提供すること。

【解決手段】 N末端側にコイルドコイル領域(1)、中央部に機能ドメイン(2)、C末端側にコイルドコイル領域(3)、及びC末端部に疎水性領域を有するエピモルフィンの全長から、C末端部の疎水性領域が削除されていると共に、コイルドコイル領域(1)及び(3)のうちの少なくとも一方の末端側から少なくとも一部のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなることを特徴とするエピモルフィン改変体。該エピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、アミノ酸の部分的な置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体。ヒト及びマウスエピモルフィン改変体及びその変異体をコードするDNA、組換えベクター、形質転換体、及びエピモルフィン改変体またはその変異体の製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 N末端側にコイルドコイル領域（1）、中央部に機能ドメイン（2）、C末端側にコイルドコイル領域（3）、及びC末端部に疎水性領域を有するエピモルフィンの全長から、C末端部の疎水性領域が削除されていると共に、コイルドコイル領域（1）及び（3）のうちの少なくとも一方の末端側から少なくとも一部のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなることを特徴とするエピモルフィン改変体。

【請求項2】 N末端側からコイルドコイル領域（1）の少なくとも一部のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる請求項1記載のエピモルフィン改変体。

【請求項3】 少なくとも機能ドメイン（2）を有する請求項1または2記載のエピモルフィン改変体。

【請求項4】 エピモルフィンがヒトエピモルフィンであって、そのコイルドコイル領域（1）のN末端から1個以上28個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる請求項1ないし3のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項5】 エピモルフィンがヒトエピモルフィンであって、そのコイルドコイル領域（1）のN末端から1個以上29個以上77個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる請求項1ないし3のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項6】 エピモルフィンがヒトエピモルフィンであって、そのコイルドコイル領域（1）のN末端から1個以上78個以上103個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる請求項1ないし3のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項7】 エピモルフィンがマウスエピモルフィンであって、そのコイルドコイル領域（1）のN末端から1個以上29個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる請求項1ないし3のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項8】 エピモルフィンがマウスエピモルフィンであって、そのコイルドコイル領域（1）のN末端から30個以上78個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる請求項1ないし3のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項9】 エピモルフィンがマウスエピモルフィンであって、そのコイルドコイル領域（1）のN末端から79個以上104個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる請求項1ないし3のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体。

【請求項10】 配列表の配列番号9ないし11、配列番号11の1～84位、配列番号12ないし14、及び配列番号14の1～84位のいずれか1つのアミノ酸配列で示されるエピモルフィン改変体。

【請求項11】 請求項1ないし10のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、該エ

モルフィン改変体の元の配列が有する機能を保持する程度に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体。

【請求項12】 請求項1ないし11のいずれか1項に記載のエピモルフィン改変体または変移エピモルフィン改変体をコードするDNA。

【請求項13】 配列表の配列番号1ないし3、及び5ないし7のいずれか1つの塩基配列で示されるエピモルフィン改変体をコードするDNA。

## 10 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、間充細胞に存在し、上皮組織の形態形成を制御するポリペプチドであるエピモルフィンを改変したエピモルフィン改変体に関し、さらに詳しくは、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の診断法・治療法の開発、あるいは新たな創傷治癒薬等の開発等に有用なエピモルフィン改変体、及びその変異体に関する。また、本発明は、このようなエピモルフィン改変体及びその変異体をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを導入した形質転換体、及び該形質転換体を用いたエピモルフィン改変体またはその変異体の製造方法に関する。なお、変異体とは、エピモルフィン改変体の元の配列が有する機能を実質的に保持する程度において、そのアミノ酸配列に、アミノ酸の部分的な置換、欠失または挿入がなされた配列をいう。

## 【0002】

【従来の技術】上皮組織の正常な形態形成は、間充細胞由来の因子による制御を受けていること、また、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の多くは、そのまわりに存在する間充細胞が原因となることから、古くから間充細胞が上皮組織の形態形成を支持するメカニズムについて研究がなされている。しかしながら、上皮組織の形態形成を制御する分子の単離及びその解析は、研究対象が複雑な系の中で時間的及び空間的な制限を受けて発現する物質のために、単純化された実験系を作ることができず、今日まで大きな進展は見られていない。上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の診断法・治療法の開発のためには、このような上皮組織の形態形成を制御する分子の単離、精製、構造解析等が不可欠の前提であり、当該物質の単離、精製、構造解析を早期に達成することが、当該分野における重要課題となっていた。

【0003】このような状況のなかで最近、本発明者らは上皮組織の形態形成を制御する分子の単離に成功し、当該分子をエピモルフィン（Epimorphin）と命名した（特開平6-25295号公報）。本発明者らは、ヒト及びマウスのエピモルフィンの配列を決定することに成功したが、エピモルフィンには、それぞれの遺伝子のスプライシングにより、各々少なくとも3種のタイプが存在する。特開平6-25295号公報に示され

ているように、ヒトエピモルフィンには、288個のアミノ酸からなるヒトエピモルフィン、287個のアミノ酸からなるヒトエピモルフィンのアイソフォームA、及び277個のアミノ酸からなるヒトエピモルフィンのアイソフォームBが存在する。同様に、マウスエピモルフィンには、289個のアミノ酸からなるマウスエピモルフィン、288個のアミノ酸からなるマウスエピモルフィンのアイソフォームA、及び279個のアミノ酸からなるマウスエピモルフィンのアイソフォームBが存在する。

【0004】しかしながら、これらのエピモルフィンは、生体内で複雑な高次構造を取り、かつ、C末端に存在する疎水性の非常に強い領域で細胞膜と結合しているため、活性を高いレベルで保持したまま分離、精製することは困難であった。細胞膜結合部分が存在すると、培養動物細胞により産生させたエピモルフィンを培養液中に分泌させて、分離、精製することが困難である。そのため、本発明者らは、C末端の疎水性の非常に強い領域を取り除く方法を提案したが（特開平6-25295号公報）、この方法は、高活性の維持と可溶性との両立の点で、いまだ不十分であった。

【0005】エピモルフィンの生理活性を高度に保持し、しかも調製及び精製が容易なエピモルフィン改変体を得ることができるならば、上皮組織の形態異常に起因する疾患の発症機序の解明と治療法の開発などに有用である。このようなエピモルフィン改変体は、火傷や手術後の各種組織の治療、あるいは人工臓器等に直接利用することができるほか、化粧品、育毛剤等の成分としても利用可能である。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、エピモルフィンの生理活性を高度に保持し、しかも調製及び精製が容易なエピモルフィン改変体及びその変異体を提供することにある。本発明の他の目的は、エピモルフィン改変体及びその変異体をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを導入した形質転換体、及び該形質転換体を用いたエピモルフィン改変体またはその変異体の製造方法を提供することにある。

【0007】本発明者らは、前記従来技術の問題点を克服するために鋭意研究した結果、C末端の疎水性部分が削除されたエピモルフィンポリペプチドからコイルドコイル領域の少なくとも一部を削除することにより、生理活性を高めることができ、その結果、生理活性と可溶性とのバランスを所望のものにすることができることを見いだした。この方法によれば、エピモルフィンの高次構造や活性に悪影響を及ぼすことなく、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の診断法・治療法の開発、あるいは新たな創傷治癒薬等の開発のために有効なエピモルフィン改変体を得ることができる。本発明は、これらの知

見に基づいて完成するに至ったものである。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】かくして、本発明によれば、N末端側にコイルドコイル領域（1）、中央部に機能ドメイン（2）、C末端側にコイルドコイル領域

（3）、及びC末端部に疎水性領域を有するエピモルフィンの全長から、C末端部の疎水性領域が削除されていると共に、コイルドコイル領域（1）及び（3）のうちの少なくとも一方の末端側から少なくとも一部のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなることを特徴とするエピモルフィン改変体が提供される。

【0009】これらのエピモルフィン改変体は、そのアミノ酸配列にアミノ酸の部分的な置換、欠失または挿入がなされた変異体（変異エピモルフィン改変体）であってもよい。また、本発明によれば、前記エピモルフィン改変体及びその変異体をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを導入した形質転換体、及び該形質転換体を用いたエピモルフィン改変体またはその変異体の製造方法が提供される。

【0010】より具体的に、本発明の実施の態様を示すと、以下のとおりである。

1. N末端側からコイルドコイル領域（1）の少なくとも一部のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる前記のエピモルフィン改変体。

2. 少なくとも機能ドメイン（2）を有する前記のエピモルフィン改変体。

3. エピモルフィンが、ヒトエピモルフィンである前記のエピモルフィン改変体。

4. コイルドコイル領域（1）のN末端から1個以上28個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる第3項に記載のエピモルフィン改変体。

5. コイルドコイル領域（1）のN末端から29個以上77個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる第3項に記載のエピモルフィン改変体。

6. コイルドコイル領域（1）のN末端から78個以上103個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる第3項に記載のエピモルフィン改変体。

【0011】7. エピモルフィンが、マウスエピモルフィンである前記のエピモルフィン改変体。

8. コイルドコイル領域（1）のN末端から1個以上29個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる第7項に記載のエピモルフィン改変体。

9. コイルドコイル領域（1）のN末端から30個以上78個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる第7項に記載のエピモルフィン改変体。

10. コイルドコイル領域（1）のN末端から79個以上104個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドからなる第7項に記載のエピモルフィン改変体。

10

40

50

11. 配列表の配列番号9ないし11、及び配列番号11の1～84位のいずれか1つのアミノ酸配列で示されるヒトエピモルフィン改変体。

12. 配列表の配列番号12ないし14、及び配列番号14の1～84位のいずれか1つのアミノ酸配列で示されるマウスエピモルフィン改変体。

【0012】13. 前記のエピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、該エピモルフィン改変体の元の配列が有する機能を保持する程度に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異エピモルフィン改変体。

14. 前記のエピモルフィン改変体をコードするDNA。

15. 前記の変異エピモルフィン改変体をコードするDNA。

16. 配列表の配列番号1ないし3のいずれか1つの塩基配列で示されるヒトエピモルフィン改変体をコードするDNA。

17. 配列表の配列番号5ないし7のいずれか1つの塩基配列で示されるマウスエピモルフィン改変体をコードするDNA。

18. 第14項または第15項に記載のDNAを含有し、ポリペプチドとして発現させることが可能な組換えベクター。

【0013】19. 第16項に記載のDNAを含有し、ポリペプチドとして発現させることが可能な組換えベクター。

20. 第18項に記載の組換えベクターを導入した形質転換体。

21. 第19項に記載の組換えベクターを導入した形質転換体。

22. 形質転換体がE. coliである第20項に記載の形質転換体。

23. 形質転換体がE. coliである第21項に記載の形質転換体。

24. 第17項に記載のDNAを含有し、ポリペプチドとして発現させることが可能な組換えベクター。

25. 第24項に記載の組換えベクターを導入した形質転換体。

26. 形質転換体がE. coliである第25項に記載の形質転換体。

27. 第20項に記載の形質転換体を用いたエピモルフィン改変体または変異エピモルフィン改変体の製造方法。

28. 第21項に記載の形質転換体を用いたヒトエピモルフィン改変体の製造方法。

29. 第25項に記載の形質転換体を用いたマウスエピモルフィン改変体の製造方法。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳述する。エピモルフィン、胎児期の上皮形成に必要な間充細胞

胞膜分子であり、生体組織の構築にも関与していると推定される。エピモルフィンは、各種の胎児組織の正常な上皮形成を阻害するモノクローナル抗体MC-1 [Cell 11, Vol. 69, p. 471-481 (1992)] により認識される抗原分子として同定された膜タンパク質である。エピモルフィンは、上皮組織を取り巻く間充細胞中に存在しており、上皮組織の形態形成を制御する等の機能を有している。このようなエピモルフィンは、通常、複雑な立体構造をとりながら、その分子中のC末端の疎水性領域により細胞膜と結合した形で機能している。エピモルフィンのcDNAから予測される物質は、分子量が約33kDaの分子であるが、生体内において、この分子は、SDS耐性の複合体を複数種形成し、そのうちの分子量が約150kDaの物質が細胞外に分泌してモノクローナル抗体MC-1によって認識されることが判明している。

【0015】本発明者らは、エピモルフィン全長を構成するアミノ酸配列をコンピューター解析した結果、図1に示すように、エピモルフィンは、構造上大きく4つのフラグメントに分けられることを見いだした。すなわち、エピモルフィンの全長を構成するポリペプチドは、N末端側より、コイルドコイル領域(1)、機能ドメイン(2)、コイルドコイル領域(3)、及びC末端の疎水性領域に分けることができる。C末端の疎水性領域(膜貫通ドメイン)を除いた領域は、疎水性アミノ酸が規則正しく並んで(heptad repeats)、いわゆるコイルドコイル構造を取りやすいN、C両末端のフラグメント[コイルドコイル領域(1)及び(3)]と、それらとほぼ同じ大きさの中央のフラグメント(2)から構成される。このフラグメント(1)及び(3)は、各々さらに細かく、4つのサブフラグメントに分離可能なことを見いだした。図2にフラグメント(1)の詳細について示す。

【0016】ヒトエピモルフィンでは、エピモルフィン、エピモルフィンのアイソフォームA、及びアイソフォームBに共通して、フラグメント(1)は、N末端からアミノ酸103個目までの領域であり、フラグメント(2)は、N末端からアミノ酸104個目から187個目までの領域であり、フラグメント(3)は、N末端からアミノ酸188個目からC末端の疎水性領域の直前までの領域である。C末端の疎水性領域は、一般に、アミノ酸23～24個程度から構成される。

【0017】マウスエピモルフィンでは、エピモルフィン、エピモルフィンのアイソフォームA、及びアイソフォームBに共通して、フラグメント(1)は、N末端からアミノ酸104個目までの領域であり、フラグメント(2)は、N末端からアミノ酸105個目から188個目までの領域であり、フラグメント(3)は、N末端からアミノ酸189個目からC末端の疎水性領域の直前までの領域である。C末端の疎水性領域は、一般に、アミ

ノ酸23~24個程度から構成される。

【0018】本発明者らの研究結果によれば、中央フラグメント(2)が機能ドメインであることが判明した。エピモルフィンの中央部領域に機能ドメインが存在することは、フラグメント(2)やフラグメント(23)、フラグメント(123)などのフラグメント(2)を含む各フラグメントと、フラグメント(13)などのフラグメント(2)を含まないフラグメントを作成し、それぞれのモノクローナル抗体MC-1との反応性、細胞接着能、あるいはサイトカインGM-CSFの分泌量を測定することにより判定することができる。

【0019】特に、フラグメント(2)及びフラグメント(23)が、モノクローナル抗体MC-1と強い反応性を示すことが分かっている。モノクローナル抗体MC-1は、生体内でエピモルフィンの活性を阻害することが判明しているため、この中央フラグメント(2)がエピモルフィンの生理活性と密接にかかわっていると推定できる。

【0020】細胞接着能については、例えば、8M尿素に溶解した各フラグメントをそれぞれ細胞培養用に処理されていないディッシュ(dish)にコートし、8M尿素とPBS(リン酸緩衝生理食塩水)にて十分に洗浄して、各フラグメントを薄く均一にコートし、この上で上皮細胞等を培養し、その応答性を調べることで判定することができる。中央フラグメント(2)をコートしたディッシュのみに、種々の上皮細胞が速やかに接着することが分かった。この接着現象は、モノクローナル抗体MC-1を添加することにより阻害される。つまり、中央フラグメント(2)の部分が直接細胞に作用することが明らかになっている。

【0021】エピモルフィンの中央フラグメント(2)が機能ドメインであることは、次の事実からも明らかである。すなわち、特開平6-25295号公報に示されているように、エピモルフィンは、上皮組織の形態形成を促進させる機能をもつが、このことは、分子生物学的にみると、エピモルフィンが細胞の核内に何らかのシグナルを伝達しているということである。このことを定量的に確認するには、例えば、細胞が分泌する物質がエピモルフィンの投与により増減する現象を定量的に評価すればよい。後記の実施例4に示すように、フラグメント(2)及びフラグメント(123)などのフラグメント(2)を含む各フラグメントを作用させることにより、細胞(例:C3H/10T1/2 clone 8細胞)が分泌するサイトカインのGM-CSF(顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)の分泌量が大幅に増大することが確認されている。

【0022】したがって、中央フラグメント(2)がエピモルフィンの機能ドメインであることは明らかである。本発明では、エピモルフィンの機能ドメインの機能について、細胞接着性、抗体MC-1との反応性、

及びGM-CSFの分泌量の変化により確認している。エピモルフィン改変体やその変異体がエピモルフィンが有する機能を実質的に保持しているか否かは、これらの機能への少なくとも一つを有することを指標として容易に確認することができる。ただし、これらへは、エピモルフィンの機能の例示であって、エピモルフィン及びフラグメント(2)の機能は、これらに限定されるものではない。

【0023】機能ドメイン(2)は、そのエピモルフィン活性を利用して、各種用途に適用することが期待される。しかし、機能ドメイン(2)は、生理的溶液に対して殆ど溶けないものである。エピモルフィン全長からC末端部の疎水性領域を削除すると、生理的溶液に対して可溶性のポリペプチドを得ることができるが、活性の弱いものである。

【0024】エピモルフィンの各フラグメントの活性と可溶性について詳細に解析を進めた結果、フラグメント(123)は可溶性であるが、活性は極めて弱く、逆に、フラグメント(23)は、不溶性であるが高活性であることを見いだした。このことから、本発明者らは、フラグメント(1)の働きについて、以下のような仮説を立てた。すなわち、フラグメント(1)は、活性については、機能ドメインをマスクするなどの作用によりネガティブに働くが、可溶性の面では、フラグメント(23)の高次構造を変化させるなどの作用により、増大させる働きを持っている。

【0025】そこで、本発明者らは、図3に示すように、エピモルフィン全長からC末端部の疎水性領域を削除したフラグメント(123)のN末端からアミノ酸を28個(ヒトエピモルフィンの場合)または29個(マウスエピモルフィンの場合)を削除した2Mフラグメント、フラグメント(123)のN末端からアミノ酸を77個(ヒトエピモルフィンの場合)または78個(マウスエピモルフィンの場合)を削除した3Mフラグメント、及びフラグメント(123)のN末端からフラグメント(1)を削除したフラグメント(23)を作成し、各特性を解析した。

【0026】その結果、図3(右側参照)に示したように、N末端から削除するアミノ酸の数を増やすことにより、活性が上昇し、一方では、可溶性が減少するという関係が明らかになった。したがって、C末端部の疎水性領域が削除されているエピモルフィンペプチドの活性と可溶性の調節は、N末端から削除するアミノ酸の数の増減により、コントロールできることが判明した。

【0027】このように、本発明によれば、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の診断法・治療法の開発、あるいは新たな創傷治療薬等の開発のために、活性と可溶性を制御できるエピモルフィン改変体の提供が可能となった。すなわち、より活性を重視する場合には、N末端から削除するアミノ酸の数を増やしたフラグメントを

作成すればよい。ヒトエピモルフィンの場合、活性の高いエピモルフィン改変体を得るには、N末端より78個以上103個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチド、より好ましくは、N末端より91個以上103個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドを作成すればよい。マウスエピモルフィンの場合には、活性の高いエピモルフィン改変体を得るには、N末端より79個以上104個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチド、より好ましくは、N末端より92個以上104個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドを作成すればよい。例えば、フラグメント(23)を用いればよい。

【0028】より可溶性を重視する場合には、N末端から削除するアミノ酸の数を少なくしたフラグメントを作成すればよい。ヒトエピモルフィンの場合、可溶性の高いエピモルフィン改変体を得るには、N末端より1個以上28個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチド、より好ましくは、N末端より14個以上28個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドを作成すればよい。マウスエピモルフィンの場合には、可溶性の高いエピモルフィン改変体を得るには、N末端より1個以上29個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチド、より好ましくは、N末端より14個以上29個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドを作成すればよい。例えば、フラグメント(2M)を用いればよい。

【0029】また、活性及び可溶性が共にバランスよく保持されたフラグメントが使いたい場合には、N末端から削除するアミノ酸の数が上記の中間に位置するフラグメントを作成すればよい。ヒトエピモルフィンの場合には、N末端より29個以上77個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチド、より好ましくは、N末端より61個以上77個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドを作成すればよい。マウスエピモルフィンの場合には、N末端より30個以上78個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチド、より好ましくは、N末端より62個以上78個までの範囲のアミノ酸が削除された構造のポリペプチドを作成すればよい。例えば、フラグメント(3M)を用いればよい。

【0030】このように、本発明のエピモルフィン改変体は、目的や用途によりその構造を変化させて、使い分けることができる。したがって、本発明のエピモルフィン改変体を使用すれば、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の診断法・治療法の開発、あるいは新たな創傷治癒薬等の開発を、より効率的に進めることが可能となる。エピモルフィンは、約280個のアミノ酸からなるタンパク質であり、マウスエピモルフィンは、例えば、モデル動物を用いた上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の発生メカニズムの解明等に有用である。ヒトエ

モルフィンは、例えば、上記の疾患の診断・治療等に有用である。これらの分子は、上皮組織を取り巻く間充細胞中に存在しており、上皮組織の形態形成を制御する等の機能を有している。

【0031】エピモルフィンのN末端からアミノ酸を削除する方法としては、生化学的手法や遺伝子工学的手法等の方法を採用することができる。生化学的手法を用いた方法としては、エピモルフィンを化学的あるいは物理的に切断し、上記フラグメントを得ることができる。遺伝子工学的手法を用いた方法としては、各フラグメントのエピモルフィンをコードするcDNAを適当なベクターに組み込んで宿主中で発現させる方法を例示することができる。具体的な方法としては、例えば、次に示すような手法が簡便なものとして利用できる。

【0032】まず、エピモルフィン全長をコードするcDNA(A)をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により合成し、一方、作成するエピモルフィンのN末端、C末端の10ないし20塩基がつながった一本鎖DNA(BおよびC)を各々DNA合成装置により作成する。次に、(A)をテンプレートとし、(B)及び(C)をプライマーとし、PCRにより目的のエピモルフィン改変体をコードする二本鎖DNAを得る。

【0033】得られた二本鎖DNAは発現するための構造を備えたベクター、例えば、pET3C(RIKEN DNA Bank RDB519)等に組み込み、組換えベクターを作成する。次にこの組換えベクターを適当な宿主、例えば、BL21(RIKEN DNA Bank RDB022)等に導入し、形質転換体を得る。さらに、この形質転換体を大量に増殖させた後、発現を誘導する処置、例えば、IPTGを培地中に終濃度1mMになるよう添加する等を行い、目的のエピモルフィン改変体を得る。

【0034】後記の配列表には、ヒトエピモルフィンのフラグメント(2M)、(3M)、(23)、(2)、及び(123)をコードするDNA配列が示されている。配列番号1は、ヒトエピモルフィンのフラグメント(2M)のDNA配列、配列番号2は、ヒトエピモルフィンのフラグメント(3M)のDNA配列、配列番号3は、ヒトエピモルフィンのフラグメント(23)のDNA配列、そして、配列番号4は、ヒトエピモルフィンのフラグメント(123)のDNA配列である。配列番号3のフラグメント(23)のDNA配列の1位から252位までがフラグメント(2)のDNA配列である。

【0035】配列表には、マウスエピモルフィンのフラグメント(2M)、(3M)、(23)、及び(123)をコードするDNA配列が示されている。配列番号5は、マウスエピモルフィンのフラグメント(2M)のDNA配列、配列番号6は、マウスエピモルフィンのフラグメント(3M)のDNA配列、配列番号7は、マウスエピモルフィンのフラグメント(23)のDNA配

列、そして、配列番号8はマウスエピモルフィンのフラグメント(123)のDNA配列である。配列番号7のフラグメント(23)の1位から252位までがフラグメント(2)のDNA配列である。

【0036】配列表には、ヒトエピモルフィンのフラグメント(2M)、(3M)、(2)及び(23)のアミノ酸配列が示されている。配列番号9は、ヒトエピモルフィンのフラグメント(2M)のアミノ酸配列、配列番号10は、ヒトエピモルフィンのフラグメント(3M)のアミノ酸配列、そして、配列番号11は、ヒトエピモルフィンのフラグメント(23)のアミノ酸配列である。配列番号11のフラグメント(23)の1位から84位までがフラグメント(2)のアミノ酸配列である。

【0037】配列表には、マウスエピモルフィンのフラグメント(2M)、(3M)、(2)及び(23)のアミノ酸配列が示されている。配列番号12は、マウスエピモルフィンのフラグメント(2M)のアミノ酸配列、配列番号13は、マウスエピモルフィンのフラグメント(3M)のアミノ酸配列、そして、配列番号14は、マウスエピモルフィンのフラグメント(23)のアミノ酸配列である。配列番号14のフラグメント(23)の1位から84位までがフラグメント(2)のアミノ酸配列である。

【0038】本発明により得られたエピモルフィン改変体を用いることにより、医療をはじめとする種々の用途、例えば、火傷や手術後の各種組織の治療や人工臓器等に直接利用できる。また、化粧品、育毛剤等の成分としても利用できるなどの利点を有する。本発明のエピモルフィン改変体は、実質的にエピモルフィン活性を保持している限り、そのアミノ酸配列中に、部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされた変異体であってもよい。部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入は、それぞれ単独でなされてもよいが、これらが組み合わされたものであってもよい。部分的なアミノ酸の置換、欠失または挿入がなされるアミノ酸配列の箇所(変異箇所)は、通常、エピモルフィンの機能ドメイン(2)を含むポリペプチドのアミノ酸配列である。この変異箇所は、エピモルフィンの機能ドメイン(2)のアミノ酸配列であってもよい。このような変異体自体は、常法により容易に作成することが可能である。一般に、蛋白質のアミノ酸配列の一部を置換、欠失または挿入させて、該蛋白質の変異体を得ること自体は、公知の技術であり、例えば、「PCR実験マニュアル」(1991年、HJB出版局)第155～160頁に記載されているリコンビナントPCR法や「実験医学増刊Vol. 8, No. 9」(1990、羊土社)第63～67頁に記載されているPCRを使った変異遺伝子の作製法により行うことができる。本発明の変異エピモルフィン改変体は、細胞接着性などのエピモルフィン改変体が有する機能を実質的に保持しているものであることが好ましい。

# 【0039】

【実施例】以下に本発明について実施例を示してより具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例のみに限定されるものではない。

## 【0040】[実施例1] エピモルフィン改変体の作成

### (1) 細胞

エピモルフィンを発現している間葉系の細胞、例えば、大日本製薬(株)で販売しているC3H/10T1/2 clone 8(コード番号08-226)を購入し、説明書通りに培養した。

### (2) RNAの調製

RNAの調製には、ライフテックオリエンタル(株)で販売しているTRIzol Reagent(Cat. No. 15596-026)を用いた。製品に添付されているプロトコルに従いRNAを調製した。調製後のRNAは、ライフテックオリエンタル(株)製amplification grade DNase I(Cat. No. 8068SA)で、製品添付のプロトコル通り処理した。

### (3) RT-PCRによるエピモルフィンcDNAの調製

調製したRNAを元にして宝酒造(株)が販売しているRNA PCR kit(Cat. No. R012)を用いて、製品添付のプロトコル通り逆転写酵素反応を行った。次に、エピモルフィンcDNAのみを増幅するためにエピモルフィン特異的上流プライマーと下流プライマー(5' ATGCGGGACCGGCTG3' 及び 5' TCATTTTGCCAACCGA3')を用いて、製品添付のプロトコル通りPCRを行い、エピモルフィンcDNAを得た。エピモルフィン特異的上流プライマーと下流プライマーは、ベックス(株)に製造を委託した。

### 【0042】(4) 各フラグメントの調製

次に、ヒトエピモルフィンのフラグメント(2M)、(3M)、(23)、及び(123)をコードするcDNAに関し、各々のフラグメント特異的なプライマーの塩基配列を配列表の配列番号1(ヒト:2M)、配列番号2(ヒト:3M)、配列番号3(ヒト:23)、及び配列番号4(ヒト:123)より求めた。そして、上流プライマーの5'側に制限酵素Nde Iサイト(5' C ATATG3')を、また、下流プライマーの5'側に制限酵素Nhe Iサイト(5' GCTAGC3')を付加したプライマーを、ベックス(株)より購入した。同様に、マウスエピモルフィンのフラグメント(2M)、(3M)、(23)、及び(123)をコードするcDNAに関し、各々のフラグメント特異的なプライマーの塩基配列を配列表の配列番号5(マウス:2M)、配列番号6(マウス:3M)、配列番号7(マウス:23)、及び配列番号8(マウス:123)より求めた。そして、上流プライマーの5'側に制限酵素Nde Iサ



イト (5' CATATG3') を、また、下流プライマーの5'側に制限酵素NheIサイト (5' GCTAGC3') を付加したプライマーを、ベックス (株) より購入した。各々のプライマーのペアを用いて、PCRにより、各フラグメントを得た。PCRは、宝酒造 (株) が販売しているTakara Taq (Cat. No. R001A) を用いて、製品添付のプロトコル通りに行った。

#### 【0043】 (5) サブクローニング

得られた二本鎖DNAは、発現するためのベクター、例えば、pET3C (RIKEN DNA Bank RDB519) の2つのEcoRVサイトの間の領域を欠失させたものに、一般的な方法、例えば、「ラボマニュアル遺伝子工学」p. 111~114 [丸善 (株)、1988] に記載されている方法によって組み込み、組換えベクターを作成した。次に、このベクターを宿主であるBL21 (RIKEN DNA Bank RDB022) に、「ラボマニュアル遺伝子工学」p. 108~109に記載されているHanahan法により導入し、形質転換体を得た。

#### 【0044】 (6) スクリーニング

アンピシリンを50 µg/ml含むLBプレート (1% Bacto tryptone、0.5% Bacto yeast extract、1% NaCl、1.5% Bacto agar) 上で生育してくるコロニーを選ぶことで、形質転換体の1次スクリーニングとした。さらに、組換えベクターを有する形質転換体の最終確認として、形質転換体に含まれる組換えベクターをテンプレートとし、目的のエピモルフィン改変体特異的な上流プライマーと下流プライマーを用いてPCRを行い、エピモルフィンcDNAの有無を確認した (この時点で10ケ中9ケのクローンに該DNAがあった)。得られた形質転換体は、50 µg/mlアンピシリンを含む液体LB培地 (1% Bacto tryptone、0.5% Bacto yeast extract、1% NaCl) で37℃で振盪培養により、大量に増殖させた後、発現を誘導するための物質IPTGを培地中に終濃度1 mMになるように添加し、その後2時間、37℃で振盪培養を続け、種々のヒト及びマウスエピモルフィン改変体を大腸菌内で作成させた。大腸菌内の全タンパク質をSDS-PAGEの電気泳動で解析した所、すべてのエピモルフィン改変体がほぼ当量作成されていることがわかった。

#### 【0045】 [実施例2] 各々のエピモルフィン改変体の可溶性の検討

実施例1により調製した、ヒト及びマウスエピモルフィン改変体を発現させた形質転換体をLysisバッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、100 mM NaCl] に懸濁して洗い、遠心操作により菌体を沈澱させ、Lysisバッ

ファーに懸濁後、Lysosome (SIGMA L-6876) を1 mg/mlになるよう添加し、凍結融解を3回繰り返して大腸菌を溶菌させ、超音波処理を行った。その後、遠心で上清を除き、沈澱を2 M Urea / Lysisバッファーで4回洗った後、8 M Urea / Lysisバッファーに再懸濁し、遠心操作で上清画分を得た。得られた上清画分を過剰量のPBSバッファーに対して透析し、さらに遠心操作により上清と沈澱画分に分離し、各々の画分に存在する種々のエピモルフィン改変体の割合により可溶性を検討するため、SDS-PAGEの電気泳動で解析した。その結果、図3に示したように、エピモルフィンポリペプチドのN末端から削除するアミノ酸の数が多くなればなるほど溶けにくくなる傾向が見られた。

#### 【0046】 [実施例3] 各々のエピモルフィン改変体の活性の検討

エピモルフィン改変体の活性評価の指標として、培養細胞との結合性について検討した。実施例2で調製したエピモルフィン改変体 (8 M Urea / Lysisバッファーに懸濁しているもの) を浮遊培養用ディッシュに塗布し、乾燥後、8 M Urea / Lysisバッファーで1回洗った。その後PBSでディッシュを5回洗い、培養細胞-C3H/10T1/2 clone 8 (大日本製薬 (株) 08-226) をBSA (SIGMA-A-7030) が20 mg/ml添加されたD-MEM/F-12培地 (SIGMA D8900) を用い、ディッシュにまいた。1時間、1日後に、各々ディッシュをPBSで3回洗い、次いで、0.5 N NaOHを用いて細胞を溶かした後、溶液を回収して更に超音波処理を行った。その後、該溶液中のDNA量を分光光度計で測定することによりディッシュに結合した細胞数を測定し、各々のエピモルフィン改変体の活性評価の指標とした。結果を図3に示すが、活性の程度は可溶性と反対の傾向を示した。

#### 【0047】 [実施例4] サイトカインGM-CSFの分泌量測定

1. エピモルフィンのフラグメント (2) 及び (123) のN末端にヒスチジンが6個連続したタグを付加したフラグメント (H2) 及び (H123) を、それぞれ以下のようにして作製した。ヒスチジntagの付加は、可溶性を更に高めるためと、精製目的のために行った。ヒスチジntagの付加による機能への影響はない。

(A) : マウスエピモルフィンのフラグメント (2) をコードするcDNA。

(B) : (A) のセンス鎖の5'末端の10ないし20塩基である一本鎖DNAに、該一本鎖DNAの5'末端に制限酵素NdeIを認識する塩基配列、及びヒスチジンをコードする塩基配列をつなげた一本鎖DNA。

(C) : (A) のアンチセンス鎖の5'末端側の10ないし20塩基である一本鎖DNAに、該一本鎖DNAの

5' 末端に制限酵素Nhe Iを認識する塩基配列をつなげた一本鎖DNA。

【0048】(1) (B) 及び (C) をDNA合成装置により作成した。

(2) (A) をテンプレートとし、(B) 及び (C) をプライマーとして、PCR法により二本鎖DNAを得た。これにより、(A) の塩基配列の5' 側に6個のヒスチジンをコードする塩基配列をもち、さらに5' 末端にNde Iサイト、3' 末端にNhe Iサイトをもつ二本鎖DNAを得た。

(3) 得られた二本鎖DNAを、pET3Cの2つのEcoRVサイト側の領域を欠失させたもののNde I、Nhe Iサイトに組み込み、組換えベクターを作成した。次に、このベクターを宿主である大腸菌BL21にHanahan法により導入した。

(4) この大腸菌を、50 µg/mlアンピシリンを含むLBプレート(1%Bacto tryptone、0.5%Bacto yeast extract、1%NaCl、1.5%Bacto agar)上に巻き込み、37℃で一晩培養した。

【0049】(5) 育成してくるコロニーが組換えベクターを有する形質転換体であることの確認として、通常のPCR法を行い、目的の変異エピモルフィン改変体をコードするDNAを増幅した後、アガロースゲル電気泳動法でそのバンドを確認する操作を行った。

(6) 得られた形質転換体は、50 µg/mlアンピシリンを含む液体LB培地で37℃で振盪培養により、大量に増殖させた後、発現を誘導するための物質IPTGを培地中に終濃度1 mMになるように添加し、その後2時間振盪培養を続け、種々の変異エピモルフィン改変体が大腸菌内で作成させた。

(7) (6) の大腸菌をLysisバッファーに懸濁し、遠心操作により菌体を沈殿させ、上清を捨てた \*

\* 後、再度回収し、Lysisバッファーに懸濁後Lyzozymeを1 mg/mlになるように添加し、凍結融解を3回繰り返して大腸菌を溶菌させ、超音波処理を行った。その後、遠心操作で上清を除き、沈殿を2M Urea/Lysisバッファーで4回洗った後、8M Urea/Lysisバッファーに再懸濁し、遠心操作で上清画分を得た。

【0050】さらに、QIAGEN社のNi<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Cat. No. 30230) を用いて、上清画分に含まれるフラグメント (H2) を添付のプロトコールに従って精製した。フラグメント (H123) についても、同様に調製し、精製した。

2. フラグメント (H2) 及び (H123) をそれぞれ8M Urea/Lysisバッファーを用いて、0.5 µg/µlの濃度に調整した。

3. 上記2で作製した液をそれぞれ5 µlずつ、組織培養用の24ウェルディッシュの各ウェルにコートし、約10分間室温で乾燥させた。対照には、8M Urea/Lysisバッファーのみを用いた。

4. 次に、各ウェルを8M Urea/Lysisバッファーで1回洗浄し、尿素(Urea)を除くため、さらにPBSで5回洗浄を繰り返した。

5. その後、10%の牛胎児血清を含むDH培地に懸濁したC3H/10T1/2 clone 8細胞をコンフルエントになるようにディッシュにまきこんだ。

6. 37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で18時間培養後、培養液を集めてGM-CSF(顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子)の含有量をenzyme-linked immunoassay法を用いて説明書の操作方法に従って定量した(ENDOGEN社のキットを使用)。結果を表1及び図4に示す。

【0051】

【表1】

	系列1	系列2	系列3	平均値	標準偏差
H2	29.5	33.5	30.4	31.1	2.1
H123	34.6	36.0	35.2	35.3	0.7
無処理	14.7	11.3	3.3	9.8	5.9

表1及び図4の結果から、エピモルフィンのフラグメント(2)及び(123)のN末端にヒスチジンが6個連続したタグを付加したフラグメント(H2)及び(H123)の添加により、GM-CSFの分泌は、2倍以上に増え、しかも両者は、バラツキの範囲を考慮して同程度の分泌促進の効果を有していることが分かった。結局、これらの実験結果から、エピモルフィンのフラグメント(2)が機能ドメインであることが明らかである。

【0052】[実施例5] 変異エピモルフィン改変体の作製

(A) : マウスエピモルフィンのフラグメント(2)を ※50

※コードするcDNA。

(B) : (A) のセンス鎖の5' 末端の10ないし20塩基である一本鎖DNAに、該一本鎖DNAの5' 末端に制限酵素Nde Iを認識する塩基配列をつなげた一本鎖DNA。

(C) : (A) のアンチセンス鎖の5' 末端側の10ないし20塩基である一本鎖DNAに、該一本鎖DNAの5' 末端に制限酵素Nhe Iを認識する塩基配列をつなげた一本鎖DNA。

(1) (B) 及び (C) をDNA合成装置により作成した。

(2) (A) をテンプレートとし、(B) 及び (C) をプライマーとして、PCR法により二本鎖DNAを得た。この際、PCR条件は、Technique a journal of methods in cell and molecular biology, Vol. 1, No. 1 (August), 1989, p. 11-15 に記載の通り行った。これにより、

(A) の塩基配列の一部に置換変異を持つ変異エピモルフィンフラグメント (2) をコードするDNA (複数) を得た。

(3) 得られたDNAをpET3Cの2つのEcoRVサイト側の領域を欠失させたもののNdeI、NheIサイトに組み込み、組換えベクターを作成した。次に、このベクターを宿主である大腸菌BL21にHanahan法により導入した。

【0053】(4) この大腸菌を50 µg/mlアンピシリンを含むLBプレート (1% Bacto tryptone、0.5% Bacto yeast extract、1% NaCl、1.5% Bacto agar) 上に巻き込み、37℃で一晩培養した。

(5) 生育してくるコロニーが組換えベクターを有する形質転換体であることの確認として、通常のPCR法を行い、目的の変異エピモルフィン改変体をコードするDNAを増幅した後、アガロースゲル電気泳動法でそのバンドを確認する操作を行った。

(6) 得られた形質転換体は、50 µg/mlアンピシリンを含む液体LB培地で37℃で振盪培養により、大量に増殖させた後、発現を誘導するための物質IPTGを培地中に終濃度1 mMになるように添加し、その後2時間振盪培養を続け、種々の変異エピモルフィン改変体が大腸菌内で作成させた。

(7) (6) の大腸菌をLysisバッファーに懸濁して洗い、遠心操作により菌体を沈殿させ、上清を捨てた後、再度回収し、Lysisバッファーに懸濁後Lyzozymeを1 mg/mlになるように添加し、凍結融解を3回繰り返して大腸菌を溶菌させ、超音波処理を行った。その後、遠心操作で上清を除き、沈殿を2MU r \*

\* ea/Lysisバッファーで4回洗った後、8MU rea/Lysisバッファーに再懸濁し、遠心操作で上清画分を得た。

#### 【0054】[実施例6] 変異エピモルフィン改変体のアミノ酸配列の決定

実施例5 (5) のコロニーの大腸菌内のプラスミドDNAをアルカリ法 (「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善(株)、第51~53頁、1988) で調製し、変異エピモルフィン改変体をコードするDNAの塩基配列をDNAシーケンサーで解析した。これによってコードされるアミノ酸配列を決定し、実施例5で得られた対応する変異エピモルフィン改変体のアミノ酸配列として決定した。

#### 【0055】[実施例7] 変異エピモルフィン改変体の細胞培養に評価

(1) 実施例5で調製した変異エピモルフィン改変体 (8MU rea/Lysisバッファーに懸濁しているもの) を、浮遊培養ディッシュに10 µg/cm<sup>2</sup>になるように塗布し、乾燥後、8MU rea/Lysisバッファーで1回洗った。その後、PBSでディッシュを5回洗い、培養細胞CH3/10T1/2 clone 8を、BSAが20 mg/ml添加されたD-MEM/F-12培地 (SIGMA D8900) を用いてディッシュにまいた。

(2) 1時間後に、ディッシュをPBSで3回洗った後、0.5 N NaOHを用いて細胞を回収した。そのDNA量を反映するOD260 nmの値を分光光度計で測定した。その結果、変異していないエピモルフィン改変体の吸光度が0.33 ± 0.015であるのに対して、ほぼこの範囲の吸光度が得られた変異体は6種あった。これより、エピモルフィン改変体には、一部のアミノ酸配列を変異させたものが許容されることが判明した。実施例5~7で作製し、評価したマウスエピモルフィン改変体の変異体 (a~f) の変異した部分は、表2に示す通りであった。

#### 【0056】

#### 【表2】

変異体	変異位置(*1)	元のアミノ酸	変異したアミノ酸
a	149 番目	Ile	Val
	175 番目	Ser	Pro
b	175 番目	Ser	Thr
c	115 番目	Ile	Val
	127 番目	Phe	Leu
	130 番目	Val	Ala
	131 番目	Met	Thr
	139 番目	Ile	Val
	154 番目	Glu	Val
	166 番目	Glu	Asp
	177 番目	Phe	Leu
d	134 番目	Tyr	Phe
	171 番目	Ser	Gly
	178 番目	Ile	Thr
	179 番目	Ser	Pro
	180 番目	Asp	Gly
e	133 番目	Glu	Val
	145 番目	Ser	Gly
	155 番目	Ile	Asn
	162 番目	Asp	Gly
	177 番目	Phe	Ser
f	122 番目	Asp	Gly
	115 番目	Ile	Leu
	131 番目	Met	Val
	155 番目	Ile	Phe

(\*1) マウスエピモルフィン全長のN末端から数えた番号である。

#### 【0057】

【発明の効果】本発明によれば、活性と可溶性が共に優れたエピモルフィン改変体、特に活性に特に優れたエピモルフィン改変体、あるいは特に可溶性に特に優れたエピモルフィン改変体が提供される。また、本発明によれば、エピモルフィン改変体のアミノ酸配列に、アミノ酸の部分的な置換、欠失または挿入がなされた変異体が提供押される。研究、医療分野等において、その目的によって、用いるエピモルフィン改変体またはその変異体を使い分けることにより、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の診断法・治療法の開発、あるいは新たな創傷 \*

\* 治癒薬等の開発をより効率的に進めることが可能となった。また、これらのエピモルフィン改変体及びその変異体は、医療をはじめとする種々の用途、例えば、火傷や手術後の各種組織の治療や、人工臓器等に直接利用できる他、化粧品、育毛剤等の成分としても有用である。

#### 30 【0058】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：711

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

##### 配列

```

ATG GAT GAT TTC TTC CAT CAG GTG GAG GAG AAT AGA AAC AGT ATT GAT 48
AAA ATA ACT CAA TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT 96
CTT TCT GCA CCA AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT 144
CTG AAC AAA GAA ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA 192
AAG GCT ATT GAA CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT 240
TCA GTG GAT CTT CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG 288
AAG TTT GTG GAA GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT 336
CGG GAG CGG AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG 384
AGA ACC ACC ACA GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG 432
CCA TCC ATC TTC ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA 480
CAA GCT CTC AAT GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG 528
GAG ACC AGC ATC CGA GAG TTG CAT GAG GTG TTC ATG GAC ATG GCT ATG 576

```

21

22

TTT GTG GAG ACT CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT 624  
 ATG AAT GCC ACA GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA 672  
 GCT ATC AAA TAT CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGA 711

【0059】配列番号：2

\* 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：564

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：cDNA

配列

AAC AAA GAA ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG 48  
 GCT ATT GAA CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA 96  
 GTG GAT CTT CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG 144  
 TTT GTG GAA GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG 192  
 GAG CGG AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA 240  
 ACC ACC ACA GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA 288  
 TCC ATC TTC ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA 336  
 GCT CTC AAT GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG 384  
 ACC AGC ATC CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT 432  
 GTG GAG ACT CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG 480  
 AAT GCC ACA GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT 528  
 ATC AAA TAT CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGA 564

【0060】配列番号：3

※ 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：486

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：cDNA

配列

AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT 48  
 TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG 96  
 GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG 144  
 CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG 192  
 CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT 240  
 TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG 288  
 GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC 336  
 ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC 384  
 ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA 432  
 GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA 480  
 AAG TGA 486

【0061】配列番号：4

★ 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：795

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：cDNA

配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 48  
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 96  
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 144  
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 192  
 AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 240  
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 288  
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 336  
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 384  
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 432  
 AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 480  
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 528  
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAAATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 576

23

24

GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 624  
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 672  
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 720  
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 768  
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGA 795

【0062】配列番号：5

\* 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：711

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC GGT TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC 48  
 AGG ATT GCT CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC 96  
 CTG TCT GCT CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC 144  
 CTG AAC AAA GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG 192  
 AAG TCT ATT GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT 240  
 TCA GTG GAT CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG 288  
 AAG TTT GTG GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC 336  
 CGG GAG CGA AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG 384  
 AGG ACC ACC ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG 432  
 CCG TCC ATC TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG 480  
 CAA GCT CTC AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG 528  
 GAG ACC AGC ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG 576  
 TTT GTC GAG ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG 624  
 GTG AAC TCT GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA 672  
 GCC ATC AAA TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGA 711

【0063】配列番号：6

※ 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：564

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：cDNA

配列

AAC AAA GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG 48  
 TCT ATT GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA 96  
 GTG GAT CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG 144  
 TTT GTG GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG 192  
 GAG CGA AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG 240  
 ACC ACC ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG 288  
 TCC ATC TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA 336  
 GCT CTC AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG 384  
 ACC AGC ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT 432  
 GTC GAG ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG 480  
 AAC TCT GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC 528  
 ATC AAA TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGA 564

【0064】配列番号：7

★ 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：486

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：cDNA

配列

AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC 48  
 TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA 96  
 GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG 144  
 CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG 192  
 CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT 240  
 TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA 288

25

26

GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC 336  
 ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC 384  
 ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG 432  
 GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA 480  
 AAG TGA 486

【0065】配列番号：8

\* 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：798

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

\* 配列の種類：cDNA

配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 48  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 96  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 144  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 192  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 240  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 288  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 336  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 384  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 432  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 480  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 528  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 576  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 624  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 672  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 720  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 768  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGA 798

【0066】配列番号：9

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：236

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Met Asp Asp Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Ile Thr Gln Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile  
 20 25 30  
 Leu Ser Ala Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp  
 35 40 45  
 Leu Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu  
 50 55 60  
 Lys Ala Ile Glu Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Val Asp Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg  
 85 90 95  
 Lys Phe Val Glu Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe  
 100 105 110  
 Arg Glu Arg Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly  
 115 120 125  
 Arg Thr Thr Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys  
 130 135 140  
 Pro Ser Ile Phe Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg  
 145 150 155 160

Gln Ala Leu Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu  
 165 170 175  
 Glu Thr Ser Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met  
 180 185 190  
 Phe Val Glu Thr Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val  
 195 200 205  
 Met Asn Ala Thr Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys  
 210 215 220  
 Ala Ile Lys Thr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys  
 225 230 235

【0067】配列番号：10

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：187

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Glu Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser  
 20 25 30  
 Val Asp Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys  
 35 40 45  
 Phe Val Glu Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg  
 50 55 60  
 Glu Arg Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Thr Thr Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro  
 85 90 95  
 Ser Ile Phe Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln  
 100 105 110  
 Ala Leu Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu  
 115 120 125  
 Thr Ser Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe  
 130 135 140  
 Val Glu Thr Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met  
 145 150 155 160  
 Asn Ala Thr Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala  
 165 170 175  
 Ile Lys Thr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys  
 180 185

【0068】配列番号：11

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：161

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His  
 1 5 10 15  
 Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu  
 20 25 30  
 Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln  
 35 40 50 45



29

30

Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met  
 50 55 60  
 Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys  
 85 90 95  
 Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe  
 100 105 110  
 Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn  
 115 120 125  
 Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr Asp Tyr Val Glu His Ala Lys  
 130 135 140  
 Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Thr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys  
 145 150 155 160  
 Lys

【0069】配列番号：12

配列の長さ：236

配列の型：アミノ酸

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

\*

配列

Met Asp Gly Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Ile Ala Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile  
 20 25 30  
 Leu Ser Ala Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp  
 35 40 45  
 Leu Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu  
 50 55 60  
 Lys Ser Ile Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Val Asp Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg  
 85 90 95  
 Lys Phe Val Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe  
 100 105 110  
 Arg Glu Arg Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly  
 115 120 125  
 Arg Thr Thr Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys  
 130 135 140  
 Pro Ser Ile Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Ala Leu Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu  
 165 170 175  
 Glu Thr Ser Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met  
 180 185 190  
 Phe Val Glu Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val  
 195 200 205  
 Val Asn Ser Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys  
 210 215 220  
 Ala Ile Lys Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys  
 225 230 235

【0070】配列番号：13

※50※配列の長さ：187

配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：ペプチド

\*

配列

Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys  
1 5 10 15  
Ser Ile Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser  
20 25 30  
Val Asp Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys  
35 40 45  
Phe Val Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg  
50 55 60  
Glu Arg Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg  
65 70 75 80  
Thr Thr Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro  
85 90 95  
Ser Ile Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln  
100 105 110  
Ala Leu Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu  
115 120 125  
Thr Ser Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe  
130 135 140  
Val Glu Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val  
145 150 155 160  
Asn Ser Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala  
165 170 175  
Ile Lys Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys  
180 185

【0071】配列番号：14

配列の長さ：161

配列の型：アミノ酸

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※30

配列

Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His  
1 5 10 15  
Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu  
20 25 30  
Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln  
35 40 45  
Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met  
50 55 60  
Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp  
65 75 75 80  
Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys  
85 90 95  
Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe  
100 105 110  
Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn  
115 125 125  
Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys  
130 135 140  
Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr50 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys

33

145  
Lys

150

155

34  
160

## 【図面の簡単な説明】

【図1】エピモルフィンポリペプチド全長の構造上の特徴を示す図である。

【図2】エピモルフィンフラグメント(1)の構造上の特徴を示す図である。

【図3】各エピモルフィンフラグメントの活性と可溶性の関係を示す図である。

【図4】エピモルフィンのフラグメント(2)及び(1 \* 10

\* 23)のN末端にヒスチジンが6個連続したタグを付加したフラグメント(H2)及び(H123)の添加により、細胞が分泌するGM-CSFの量が増大することを示すグラフである。

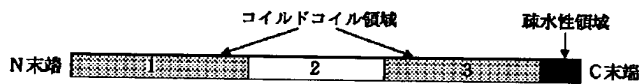
## 【符号の説明】

1:エピモルフィンのN末端側のコイルドコイル領域

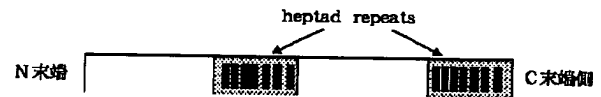
2:エピモルフィンの機能ドメイン

3:エピモルフィンのC末端側のコイルドコイル領域

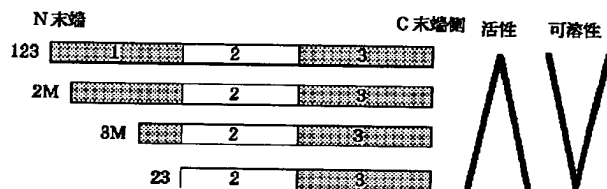
【図1】



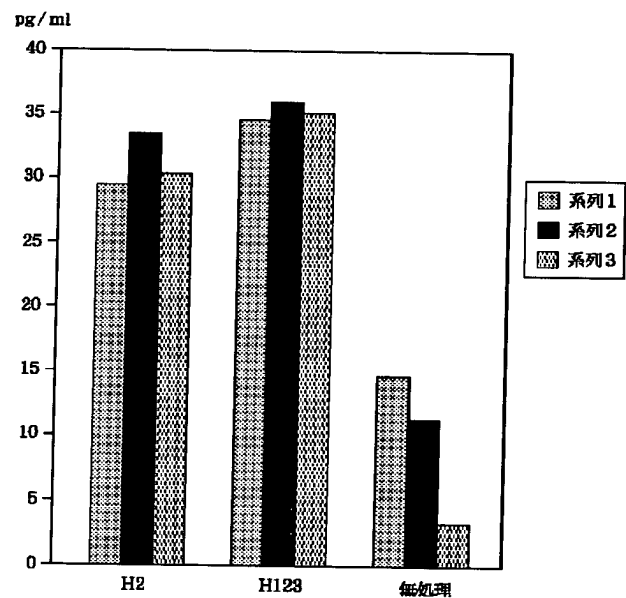
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 1 2 P 21/02

// A 6 1 K 38/00

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

ADS

C 1 2 P 21/02

A 6 1 K 37/02

C  
ADS